

# 尿中遊離アミノ酸の遺伝学的研究(3) —ヒト尿における1-メチルヒスチジンの排泄について—

平 野 久 美 子

## A Study on Amino Acids Excreted in Urine in Relation to Genetics (3)

### —Excretion of 1-Methylhistidine by Man—

By KUMIKO HIRANO

#### はじめに

当教室では病理不明の精薄児の病因をアミノ酸代謝の面から解明するための手掛りとして薄層クロマトグラフィ (TLC 以下略) を用いて尿中遊離アミノ酸排泄像の検索を行っているが、一昨年以来その研究の基礎として正常人の尿中遊離アミノ酸パターンについて遺伝的要因の検討を行ってきた。その結果については別に報告<sup>1)</sup>した。その際、未同定の No. 1 物質 (仮称) の排泄量が遺伝に支配されているのではないかと考え、その分離及び同定を試みたその結果、この No. 1 物質は 1-メチルヒスチジン (1-MeHis 以下略) であることが判明した。

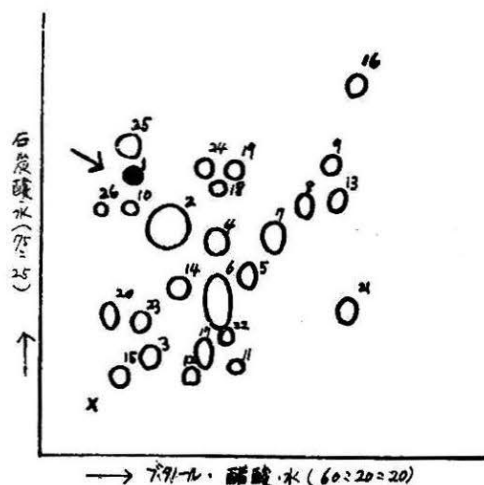
1-MeHis はアンセリンの構成成分として知られ 1951 年 Searle, Westal<sup>2)</sup> らにより遊離のアミノ酸として尿中から見出されたものである。アンセリンは食肉類特に鶏肉とまぐろに多く含まれる<sup>3)</sup>。そしてアンセリンの摂取は 1-MeHis の排泄に強い影響を与えることが Butt<sup>4)</sup> らにより報告されている。成人における 1-MeHis の尿中排泄量は Stein<sup>5)</sup> らにより報告され 47~384 mg/24 hr で著明な差があるがこれは食餌の影響によるといわれている。しかし食餌の影響を受けながらも個体差があるのではないかと考え、本実験では毎日全員が共通の食餌を摂っている施設の子供の尿と、尿中排泄量に強い影響を与えるというアンセリンの含有量の少ない乳汁のみを摂取している乳児の尿について検討した。

#### 実験方法

##### I 1-MeHis の単離

尿中両性イオン画分の二次元薄層クロマトグラムを第 1 図に示したが、その位置から 1-MeHis と推定し、尿中よりこの物質を単離し、合成 1-MeHis と比較検討した。

(1) 正常人尿中の塩基性アミノ酸画分の分離



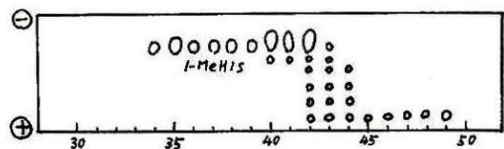
図—1 正常人尿中アミノ酸の薄層クロマトグラム

試料は健康成人女子の尿をトルエンをいれたびんに蓄尿し 3,970 ml を使用した。そのアミノ酸画分を Amberlite IR-120H 型のカラムを用いて分離した。すなわち尿 3970 ml を 6×30 cm の Amberlite IR-120H 型のカラムに注入し約 3 l の蒸留水で洗い、つぎに 2 N アンモニア溶液で溶出した。つぎにこれを Amberlite IR-120 アンモニウム型カラムを用いて塩基性画分のみを分離した。すなわち先に分離したアミノ酸画分を Amberlite IR-120 アンモニウム型のカラム (4.0×45 cm) に注入し、約 600 ml の蒸留水で洗い酸性及び中性アミノ酸群を除去した。

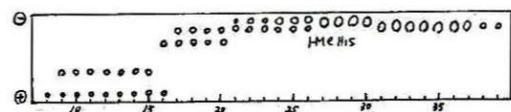
(2) No. 1 物質の単離

つぎに樹脂に吸着されている塩基性アミノ酸を 0.1 N アンモニアで溶出した。溶出液はフラクションコレクターで 15 ml ずつ分取した。No. 1 物質を含む分画は、各分画の一部をピリジン・氷酢酸・水 (5:50:945), pH 3.6 を緩衝液とし 4000 V/30 cm 20 分間高圧紙電気泳動を行い、

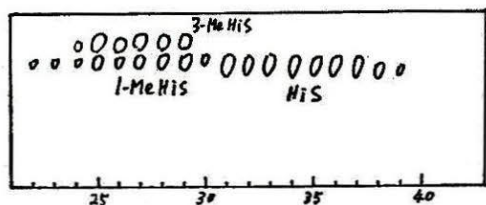
ついでニンヒドリン反応を用いて検出した。その結果を第2図に示す。No. 1 物質を含む部分即ち No. 35 より No. 42までを集めて減圧濃縮し、これを Amberlite IR-120 ピリジン型 (200~400 メッシュ)  $2 \times 26\text{cm}$  のカラムに吸着させ、これをピリジン・ギ酸・水 (16:40:1800) でクロマトグラフィーを行なった。溶出液は  $6.5\text{ml}$  ずつ分取した。各分画を高圧滲紙電気泳動法によって、その中に含まれるアミノ酸の検出を行った。その結果を第3図に示す。No. 1 物質は No. 22 から No. 37 の間に含まれていたため、この部分について、その各分画をピリジン・アセトン・アンモニア・水 (50:35:5:20) とイソプロピルアルコール・ギ酸・水 (60:15:15) の二種の展開溶媒で一次元ペーパークロマトグラフィーを行ない、各分画中のアミノ酸の検出を試みた。その結果は第4図



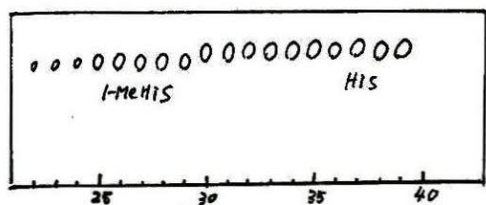
図— 2 高圧滲紙電気泳動図 Pyridine—醋酸—水 (5:50:945) pH3.6, 4 K V30cm 20分



図— 3 高圧滲紙電気泳動図 pH3.6 4 K V30cm 20分

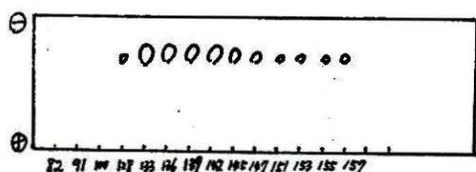


図— 4—I Isopropyl Alcohol—ギ酸—水 (60:15:15) を展開溶媒としたペーパークロマトグラム



図— 4—II Pyridine—Ammonia—水 (50:30:5:20) を展開溶媒としたペーパークロマトグラム

I, II に示す如く, No. 22 から No. 29 の間に No. 1 物質が含まれると思われる, No. 30 以降は His であると思われる。つぎに上の結果から No. 1 物質が含まれると思われる No. 25 から No. 29 の分画をあつめ、減圧濃縮後これを Amberlite IR-120 の 0.1N リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.6) で平衡化したカラム ( $2.6 \times 40.5\text{cm}$ ) に通し同じ緩衝液で溶出し、溶出液をフラクションコレクターを用い  $17\text{ml}$  ずつ分取した。各分画についてニンヒドリン反応を試みたところ第5図に示すように No. 1 物質は No. 130 から No. 155 までに溶出された。リン酸ナトリウム緩衝液をのぞく目的でこの分画を Amberlite IR-120H 型  $2 \times 15\text{cm}$  のカラムに通し、水洗後、吸着させたアミノ酸分画を 1N アンモニアで溶出した。ニンヒドリン陽性部分をあつめ、これを減圧乾固後、少量の水に溶かし、エタノールを加えて無色結晶  $200\text{mg}$  を得た。



図— 5 高圧滲紙電気泳動図 pH3.6, 4 K V30cm 20分

## II 尿遊離アミノ酸の分析

### (1) 尿処理

クレアチニン  $7\text{mg}$  相当量の尿を Amberlite CG 120H 型のカラムに流し、ついで蒸留水で樹脂を洗浄後 4N アンモニアとエタノール (1:1) の混合液  $6\text{ml}$  で溶出し、これを減圧濃縮乾固した。これを蒸留水で  $0.1\text{ml}$  に溶かしたものを試料とした。

### (2) 尿遊離アミノ酸の T. L. C

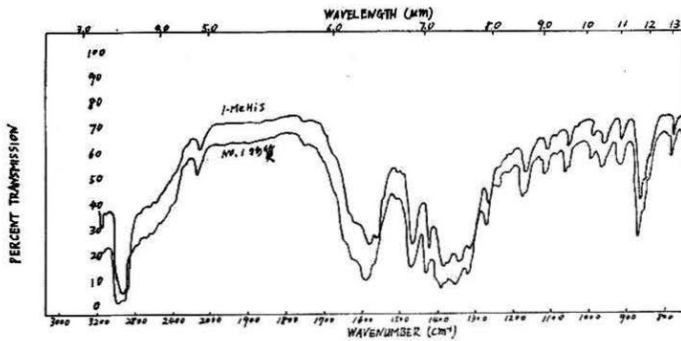
一次元を石炭酸・水 (75:25) で二次元を n-ブタノール・氷酢酸・水 (60:20:20) で展開した。展開後 0.2% ニンヒドリンブタノール液を噴霧し、 $100^\circ\text{C}$  10 分間加熱発色させた。1-MeHis のスポットが検出された場合を陽性とした。

## 実験結果

### I 1-MeHis の同定

上述の如く分離した結晶の元素分析結果は C:36.22%, H:5.43%, N:24.5% で理論値, C:35.89%, H:6.02%, N:23.93% とよく一致した又赤外線吸収の結果は第6図に示す如く合成の 1-MeHis とよく一致した。

又本結晶と合成 1-MeHis を各種の展開溶媒を用いてペーパークロマトグラフィーを行ない、その Rf を比



図— 6 No. 1 物質及び合成 1-MeHis の赤外線吸収

較した。第1表に示すように両物質の Rf はよく一致した。さらにこの両物質を混合し、これらの展開溶媒で一次元薄層クロマトグラフィーを行なったが、スポットの分離はみられなかった。さらにピリジン・酢酸・水 (5:50:945) pH3.6の緩衝液を用いて4000V/30cm電圧で20分間、高圧紙電気泳動を行なって両物質を比較した。両者の移動度は全く一致した(第1表)。以上の結果からNo. 1 物質が1-MeHisであることを確かめた。

表— 1 No. 1 物質と合成 1-MeHis のペーパークロマトグラフィーと高圧紙電気泳動

|                                      | ペーパー<br>クロマト<br>グラフィー<br>Rf |                | 高圧紙電気<br>泳動移動度<br>(4kV30cm<br>20分) |                |
|--------------------------------------|-----------------------------|----------------|------------------------------------|----------------|
|                                      | No. 1<br>物質                 | 合 成<br>1-MeHis | No. 1<br>物質                        | 合 成<br>1-MeHis |
| 石炭酸・水(75:25)                         | 0.25                        | 0.25           |                                    |                |
| n-ブタノール・酢酸・水<br>(60:20:20)           | 0.06                        | 0.06           | 13.5cm                             | 13.5cm         |
| イソプロピルアルコール、<br>ギ酸・水<br>(60:15:15)   | 0.48                        | 0.48           |                                    |                |
| ピリジン・アセトン・<br>アンモニア・水<br>(5:30:5:20) | 0.48                        | 0.48           |                                    |                |

## I 1-MeHis の尿中排泄における食餌の影響と個体差について

全員が同じ献立の食餌を摂取している大阪整肢学院に収容されている子供15名を選び、実験対象とした(第2表)。献立の異なる日(第3表)を3日選び、それぞれの食餌を摂取した翌日の早朝尿を採り、尿遊離アミノ酸の分析を行なった実験結果は第4表に示した如く、夕食の献立に肉蛋白を含む翌早朝尿の第1回、第2回の検査では1-MeHis が全員に検出された。ところが夕食の献

立に肉蛋白を含まない第3回目の検査では進行性筋ジストロフィーの患者以外全員に1-MeHis は検出されなかった。

## II 乳児の尿中 1-MeHis の排泄について

大阪乳児院に収容されている生後1〜3カ月の乳汁のみを摂取している乳児10例の尿について検討した。採尿バッグを用いて採尿し、尿遊離アミノ酸分析を行なった。その結果は第5表に示した如く、1例にも1-MeHis は検出されなかった。

## 考 察

正常人の尿中アミノ酸排泄における遺伝的要因の検討の実験中、尿中両性イオン画分の二次元薄層クロマトグラム上の未同定のあるアミノ酸(仮称 No. 1 物質)の排泄が遺伝性があるように思われた<sup>1)</sup>ので、今回この物質を尿から単離し、その同定を行なった。その結果この No. 1 物質は1-MeHis であることが判明した。1-MeHis の尿中排泄については最初にも述べた如く、従来、食餌の影響を強く受け特に食肉の摂取により、その排泄が増加することが知られている。またこれまでに報告された尿中1-MeHis の正常値にも著明な個体差があることが認められている。しかし我々が前に報告<sup>1)</sup>したような結果が果たして食餌の影響だけであったのかどうかを確

表— 2 実験対象と夕食の摂取量

| 対象<br>No. | 性別 | 年齢<br>才 | 病 名         | 夕食の摂取量 |      |      |
|-----------|----|---------|-------------|--------|------|------|
|           |    |         |             | 第1回    | 第2回  | 第3回  |
| 1         | 男  | 11      | 脳 性 麻 痺     | 全量     | 全量   | 1/2量 |
| 2         | "  | 10      | "           | "      | 1/4量 | "    |
| 3         | "  | 9       | "           | "      | "    | "    |
| 4         | "  | 11      | "           | "      | 3/8量 | 1/4量 |
| 5         | "  | 15      | "           | "      | 全量   | 1/2量 |
| 6         | 女  | 11      | "           | "      | "    | 全量   |
| 7         | 男  | 9       | "           | "      | 1/2量 | 1/2量 |
| 8         | "  | 12      | ポ リ オ 後 遺 症 | "      | 全量   | "    |
| 9         | 女  | 10      | "           | "      | 1/4量 | 3/8量 |
| 10        | "  | 10      | 左 先 股 脱     | "      | 全量   | 1/2量 |
| 11        | "  | 10      | 先 股 脱       | "      | "    | "    |
| 12        | "  | 9       | 先天性多発性関節拘縮症 | "      | "    | "    |
| 13        | 男  | 16      | 多発性関節リウマチ   | "      | 1/2量 | "    |
| 14        | "  | 16      | 胸 椎 結 核     | "      | 全量   | "    |
| 15        | "  | 19      | 進行性筋ジストロフィー | "      | 1/2量 | "    |

表—3 昼、夕食の献立

|     |      | 調理名          | 食品名    | 1人当数量<br>g | 熱量<br>cal | 蛋白質<br>g | 脂肪<br>g |
|-----|------|--------------|--------|------------|-----------|----------|---------|
| 第1回 | 昼    | えびかきあげ       | え玉     | 42         | 35        | 6.7      | 0.5     |
|     |      | きゃべつの細切り     | ねべ     | 51         | 20        | 0.6      | 0.1     |
|     |      | 煮しめ          | やけ     | 38         | 9         | 0.6      | 0.1     |
|     |      |              | ラ      | 49         | 11        | 1.2      | 0.1     |
|     |      |              | ン      | 51         | 11        | 1.2      | 0.1     |
|     | 夕    | 漬物           | ダ      | 4          | —         | 0.5      | 0.1     |
|     |      |              | ウ      | 25         | 11        | 0.9      | 0.1     |
|     |      |              | 調味料    | 14         | 2         | 0.1      | 0       |
|     |      |              | その他    |            |           |          |         |
|     |      |              | 豆腐     | 170        | 99        | 10.2     | 0.6     |
| 第2回 | 昼    | ぎせい豆腐        | 豆腐     | 34         | 46        | 7.1      | 1.7     |
|     |      |              | い      | 2          | —         | 0.3      | 0       |
|     |      |              | た      | 8          | 4         | 0.1      | 0       |
|     |      |              | まね     | 46         | 18        | 0.6      | 0.1     |
|     |      |              | ゆ      | 61         | 5         | 0.4      | 0.1     |
|     | 夕    | 漬物           | く      | 4          | 14        | 0        | 0       |
|     |      |              | 調味料    | 17         | 6         | 0.2      | 0.5     |
|     |      |              | その他    |            |           |          |         |
|     |      | 1日合計         |        | 1270.4     | 2050      | 66.9     | 21.8    |
|     |      |              |        |            |           |          |         |
| 第3回 | 昼    | 目玉ソーセージ      | 卵ソーセージ | 59         | 92        | 8.4      | 6.5     |
|     |      | ウィンナーの細切り    | ウィンナー  | 59         | 90        | 12.6     | 4.2     |
|     |      | 煮しめ          | やけ     | 43         | 9         | 0.6      | 0       |
|     |      |              | ン      | 20         | 6         | 0.4      | 0.1     |
|     |      |              | ら      | 43         | 19        | 0.2      | 0.1     |
|     | 夕    | 漬物           | ん      | 10         | 64        | 0.3      | 7.0     |
|     |      |              | 調味料    | 17         | 6         | 0.3      | 0.5     |
|     |      |              | その他    |            |           |          |         |
|     |      | ハンバーグステーキ    | ミ      | 34         | 52        | 7.3      | 2.4     |
|     |      |              | 玉      | 61         | 13        | 0.8      | 0.1     |
| 第4回 | 昼    | きやべつの細切り     | や      | 9          | 29        | 0.6      | 0.1     |
|     |      | 煮しめ          | 卵      | 38         | 8         | 0.5      | 0       |
|     |      |              | ン      | 43         | 67        | 6.1      | 4.7     |
|     |      |              | れ      | 38         | 24        | 0.9      | 0       |
|     |      |              | オ      | 31         | 11        | 0.6      | 0.1     |
|     | 夕    | 漬物           | ラ      | 18         | 5         | 0.3      | 0.1     |
|     |      |              | 調味料    |            |           |          |         |
|     |      |              | その他    |            |           |          |         |
|     |      | 1日合計         |        | 1171.0     | 2024      | 70.5     | 39.5    |
|     |      |              |        |            |           |          |         |
| 第5回 | 昼    | 煮焼豆腐と竹の子の煮しめ | か焼たわき  | 151        | 174       | 34.0     | 3.0     |
|     |      |              | れ豆     | 125        | 205       | 11.1     | 18.9    |
|     |      |              | け      | 151        | 33        | 2.0      | 0.2     |
|     |      |              | ゆ      | 4          | —         | 0.3      | 0.3     |
|     |      |              | 調味料    | 14         | 4         | 0.2      | 0       |
|     | 夕    | 卵み           | こ      | 59         | 92        | 8.4      | 6.5     |
|     |      | 豆            | 大      | 75         | 6.3       | 1.7      | 0.2     |
|     |      | 腐煮           | ん      | 75         | 17        | 1.0      | 0.1     |
|     |      |              | に      | 33         | —         | —        | —       |
|     |      |              | 調味料    | 17         | 5         | 0.3      | 0.1     |
| 第6回 | 1日合計 |              |        | 1243.3     | 2367      | 84.0     | 42.3    |
|     |      |              |        |            |           |          |         |

註) 朝食は毎日パン、バター、ジャム、紅茶、その他おやつを摂取している

認するために、すなわち食餌の影響を受けながらも遺伝による支配をいくらかでも受けてその排泄に個体差がないであろうかと思ひ、毎日全員が共通の献立の食餌を摂取している施設の子供15名について夕食の献立の異なる日

3回を選び、それぞれ翌早朝尿を採取し、尿アミノ酸分析を行なったところ、夕食の献立に肉蛋白を含む翌早朝尿の第1回、第2回検査では 1-MeHis が全員に検出された。ところが夕食の献立に肉蛋白を含まない第3回



表-4 1-MeHis の排泄

| 対象<br>No. | 夕食<br>の献立 | 第 1 回<br>ぎせい豆腐<br>膾 | 第 2 回<br>ハンバーグ<br>ステーキ<br>煮しめ | 第 3 回<br>卵<br>豆<br>腐<br>煮 |
|-----------|-----------|---------------------|-------------------------------|---------------------------|
| 1         |           | +                   | +                             | -                         |
| 2         |           | +                   | +                             | -                         |
| 3         |           | +                   | +                             | -                         |
| 4         |           | +                   | +                             | -                         |
| 5         |           | +                   | +                             | -                         |
| 6         |           | +                   | +                             | -                         |
| 7         |           | +                   | +                             | -                         |
| 8         |           | +                   | +                             | -                         |
| 9         |           | +                   | +                             | -                         |
| 10        |           | +                   | +                             | -                         |
| 11        |           | +                   | +                             | -                         |
| 12        |           | +                   | +                             | -                         |
| 13        |           | +                   | +                             | -                         |
| 14        |           | +                   | +                             | -                         |
| 15        |           | +                   | +                             | +                         |

表-5 乳児の 1-MeHis の尿中排泄

| 対象 No. | 性 別 | 年 令   | 1-MeHis |
|--------|-----|-------|---------|
| 1      | 男   | 1 カ 月 | -       |
| 2      | "   | "     | -       |
| 3      | "   | "     | -       |
| 4      | 女   | "     | -       |
| 5      | 男   | 3 カ 月 | -       |
| 6      | 女   | "     | -       |
| 7      | "   | "     | -       |
| 8      | "   | "     | -       |
| 9      | "   | "     | -       |
| 10     | "   | "     | -       |

目の検査では進行性筋ジストロフィーの患者 1 名を除いて全員に検出されなかった。

家兎を V. E 欠乏の状態にさせると数週で筋萎縮が起こり足をひきずるようになり体温が低下してついに死亡するといわれている<sup>6)</sup>。これはヒトの進行性筋ジストロフィーとよく似た病像を示すといわれており進行性筋ジストロフィーと関連して V. E 欠乏家兎での詳細な研究がなされ、V. E 欠乏家兎で 1-MeHis の尿中排泄が増加することが報告<sup>7)</sup>されているが、本実験において進行性筋ジストロフィーの患者が肉蛋白を含まない食餌を摂取した時にも 1-MeHis が検出されたことは興味がある。この 1 例を除いて全員が肉蛋白の摂取と 1-MeHis の排泄が並行したことは、このアミノ酸の排泄は遺

伝による影響は受けていないと考えられる。さらに 1-MeHis の尿中排泄に強い影響を与えるといわれるアンセリンの含有量の少ない乳汁のみを摂取している生後 1～3 カ月の乳児 10 例の尿に 1-MeHis が 1 例にも検出されなかったことから 1-MeHis の排泄は食肉中のアンセリンのみに由来し、遺伝による支配は受けていないものと考えられる。従って前回の結果、すなわち 1-MeHis の排泄が家族的にみられたこと<sup>4)</sup>又双生児においてその排泄一致率が 100%であったこと<sup>8)</sup>は、同じ家庭で同じ食餌を摂取していたためであろうと考えられる。

尿中アミノ酸の中で遺伝的に興味をもたれ詳細に研究されているのは  $\beta$ -アミノイソ酪酸 ( $\beta$ -AIB 以下略) である。このアミノ酸はヒト尿では必ず検出されるが、その濃度は著しい個体差があり 1 日 10mg 以下の少量のものから 100～300mg の多量のものまでである。しかし各個人についてはその濃度は比較的一定している。柿本らは  $\beta$ -AIB の濃度は 1 対の対立遺伝子の支配を強く受けていること、すなわち高排泄者は劣性対立遺伝子のホモ接合体であることを証明した<sup>8)</sup>。元来アミノ酸の排泄は量的なもので連続的に変化するものである。人類のこのような量的形質は、たいてい多因子遺伝により支配されていると考えられ、遺伝子効果を見わけすることは不可能であるが、1-MeHis の排泄については  $\beta$ -AIB の排泄の如きははっきり区別のできる効果を示すような主要遺伝子による支配は受けていないと考えられる。

## 要 約

- (1) ヒト尿から 1-MeHis を単離、同定した。
- (2) 共通の献立の食餌を摂取している施設の子供 15 名の 1-MeHis の排泄は進行性筋ジストロフィー症の 1 例を除いて全員が、夕食の献立に肉蛋白を含む翌早朝尿には 1-MeHis が検出され、一方夕食の献立に肉蛋白を含まない翌早朝尿には検出されなかった。
- (3) 乳汁のみを摂取している 1～3 カ月の乳児 10 名の尿中には 1-MeHis は全員検出されなかった。
- (4) 従って 1-MeHis の排泄は  $\beta$ -AIB の排泄の如き単一对立遺伝子による支配は受けていないと結論した。

おわりに合成 1-MeHis を分与して下さり、又本物質の尿からの単離同定の方法について御指導下さいました大阪大学柿本助教授に深く感謝いたします。又実験にあたり種々の御便宜や御援助を頂いた本学山本勝朗教授に深く感謝いたします。又材料の採取に御協力下さいました大阪整肢学院並びに大阪乳児院の職員の方々に謝意

を表します。又元素分析、赤外線吸収の測定をして下さった本学理学部の三輪教授に謝意を表します。

# 文 献

- 1) 平野久美子・川本直子：本紀要, 16, 203 (1968)
- 2) Searle, I. M., and Westall, R. G., : Biochem. J., 48, 1 (1951)
- 3) 香月義美：日本小児科学会雑誌, 73, 1632 (1969)
- 4) Butt, J. H. and Flesher, B., : Proc. Soc. Exp.

- Biol. Med., 118, 722 (1965)
- 5) Stein, W. H. : J. Biol. Chem., 201, 45 (1953)
- 6) 香月義美：日本小児科学会雑誌, 73, 1776 (1969)
- 7) Fink, K., Williams, A. D. and Fink, R. M. : J. Biol. Chem., 234, 1182 (1959)
- 8) 平野久美子・中村寿也子：本紀要, 18, 211 (1970)
- 9) J. Yanai, Y. Kakimoto, T. Tsujio, I. Sano. : Am. J. Human Genetics, 21, 115 (1969)

## Summary

I-methylhistidine (I-MeHis) was isolated from human urine. The compound was crystallized and its properties were compared with those of the synthetic compound.

The first urine excreted in the morning was collected from I5 children who had taken common diet in the institution.

I-MeHis was detected in the urine from I4 children who had taken the diet with meat in the previous evening meal, but not detected excluding meat.

I-MeHis was not detected in the urine of I0 infants on milk diet only.

These facts suggest that the urinary excretion of I-MeHis is not regulated by a gene.